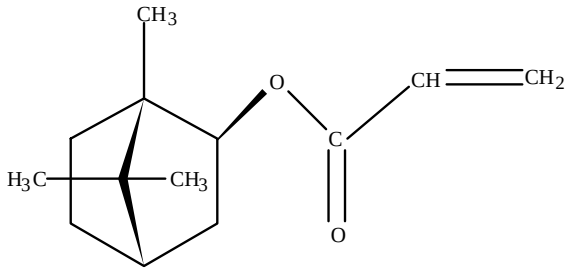
微生物を用いる変異原性試験結果報告書

1.　一般的事項

新規化学物質の名称 (IUPAC 命名法による)	アクリル酸＝２－ボルニル		
別　　名	（１Ｒ，２Ｒ，４Ｒ）－ｒｅｌ－１，７，７－トリメチルビシクロ［２．２．１］ヘプタン－２－イル＝アクリラート* アクリル酸イソボルニル		
構造式又は示性式（いずれも不明な場合はその製法の概要）			
試験に供した新規化学物質の純度	95.9%	試験に供した新規化学物質の Lot No.	503B2051
不純物の名称及び濃度			
CAS 番号	5888-33-5	蒸気圧	
分子量	208.30	分配係数	
融　点	＜–35°C	常温における性状	液体
沸　点	119-121°C （15 mmHg）＊		
安定性	適切な条件下においては安定。		

溶媒に対する溶解度等	溶媒	溶解度	溶媒中での安定性
	水	50 mg/mL で不溶	発熱、ガスの発生等の反応性なし
	DMSO	50 mg/mL で不溶	発熱、ガスの発生等の反応性なし
	アセトン	100 mg/mL で溶解	発熱、ガスの発生等の反応性なし
	その他		

(備考)　上記被験物質情報は、製造元からの情報及び*：独立行政法人製品評価技術基盤機構化学物質総合情報システム（CHRIP）の情報による。なお、溶解度及び溶媒中での安定性については、株式会社ボゾリサーチセンターで実施した溶解性試験の結果である。

2.　試験に用いた菌株

菌株名	入手先	入手年月日
Salmonella typhimurium TA98	国立医薬品食品衛生研究所	1997 年 10 月 9 日
Salmonella typhimurium TA100	国立医薬品食品衛生研究所	1997 年 10 月 9 日
Salmonella typhimurium TA1535	国立医薬品食品衛生研究所	1997 年 10 月 9 日
Salmonella typhimurium TA1537	国立医薬品食品衛生研究所	1997 年 10 月 9 日
Escherichia coli WP2 *uvrA*	独立行政法人 製品評価技術基盤機構	2011 年 10 月 20 日

3.　S9 Mix

(1)　S9 の入手方法等

自製・購入の別	1.自製 ②. 購入（製造元：キッコーマンバイオケミファ株式会社）
製造年月日	2013 年 9 月 26 日製造 [1)]　2013 年 10 月 25 日製造 [2)]
購入の場合 Lot No.	RAA20130926 [1)]　RAA20131025 [2)]
保存温度	–88.1~ –78.8°C （保存期間：2013 年 10 月 23 日~2014 年 2 月 12 日）

(2)　S9 の調製方法

使　用　動　物		誘　導　物　質	
種・系統	ラット･SD 系	名称	PB& 5,6-BF
性	雄	投与方法	腹腔内投与
週齢	7 週齢	投与期間及び 投与量 (mg/kg 体重)	PB4 日間連続投与: 30+60+60+60(mg/kg 体重) PB 投与 3 日目 BF 投与: 80(mg/kg 体重)
体重	187–230 g [1)]　195–247 g [2)]		

1）用量設定試験、本試験 1 回目に使用　2）本試験 2 回目に使用

(3)　S9Mix の組成

成　　分	S9Mix 1mL 中の量	成　　分	S9Mix 1mL 中の量
S9	0.1 mL	NADPH	4 µmol
$MgCl_2$	8 µmol	NADH	4 µmol
KCl	33 µmol	Na-リン酸緩衝液	100 µmol
グルコース-6-リン酸	5 µmol	その他（　　）	

4.　被験物質溶液の調製

使用溶媒	名　称	製　造　元	Lot No.	グレード	純度(%)
	アセトン	和光純薬工業株式会社	AWF1308	JIS 規格 試薬特級	99.5%以上
溶媒選択の理由	水、DMSO、アセトンについて溶解性を実施した。その結果、水、DMSO に 50 mg/mL で溶解せず、アセトンに 100 mg/mL で溶解し、発熱、ガスの発生等の反応性も認められなかったためアセトンを溶媒として試験を実施した。				
被験物質溶液の性状	(溶解)　懸濁　その他				
被験物質が難溶性の場合における懸濁等の方法					
溶液の調製から使用までの保存時間と温度	用時調製・室温				
純度換算の有無	有　(無)				

5.　前培養の条件

(1)　条件

ニュートリエントブロス	名　称	製　造　元	Lot No.
	Nutrient Broth No.2	OXOID LTD.	876774
前培養時間	9 時間		
培養容器(形状・容器)	L 字管・48mL		
培養液量	10 mL	接種菌量	*S. typhimurium* 株　20 µL *E. coli* 株　10 µL

(2)　前培養終了時の生菌数等

菌株名		塩基対置換型			フレームシフト型	
		TA100	TA1535	WP2 *uvrA*	TA98	TA1537
生菌数 (× 10^9/mL)	用量設定試験	5.40	6.07	8.81	6.82	4.41
	本試験 1 回目	5.43	6.60	8.82	6.70	4.64
	本試験 2 回目	5.35	6.39	8.76	6.84	4.56
測定方法	(1.)　O.D.値より換算　2.　段階希釈法　3.　その他					

6.　最小グルコース寒天平板培地

自製･購入の別	1.　自製　　②.　購入（購入元　極東製薬工業株式会社）
製 造 年 月 日	2013 年 10 月 16 日製造
購入の場合の Lot No.	DZLEAG01
使用寒天の名称･製造･Lot No.	OXOID AGAR No.1･OXOID LTD.･Lot No. 1213483-02

7.　試験の方法

(1)　試験方法とその選択理由

採用した試験方法	①.　プレインキュベーション法　　2.　プレート法 3.　その他
その他の場合は その選択理由	

(2)　試験条件

組　　成	菌懸濁液	0.1 mL
	被験物質溶液	0.1 mL
	Na-リン酸緩衝液（直接法による場合）	0.5 mL
	S9Mix（代謝活性化法による場合）	0.5 mL
	トップアガー	2.0 mL
プレインキュベーション	温度	37°C
	時間	20 分間
インキュベーション	温度	37°C
	時間（用量設定試験）	48 時間
	時間（本試験 1 回目）	49.5 時間
	時間（本試験 2 回目）	48 時間

8.　コロニー計測の方法

計測方法	1.　マニュアル計測　　②.　機器計測
補正の有無	1.　無　　②.　有（補正の方法　面積補正:補正値　1.21）

9.　試験の結果

(1)　試験の結果は別表による。

(2)　結果の判定

判　定	陽性　　(陰性)

判定の理由

用量設定試験の結果を別表 1、本試験 1 回目の結果を別表 2、本試験 2 回目の結果を別表 3 に示した。なお、図 1~10 は別表 2 より作成した。また、当該試験の参考データとして参照した背景データを Attached Data として添付した。

用量設定試験及び 2 回の本試験のいずれも代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの菌株においても陰性対照値の 2 倍以上となる復帰変異コロニー数の増加は認められず、用量反応性も認められなかった。

一方、陽性対照群では陰性対照群と比較して 2 倍以上となる復帰変異コロニー数の増加を示したことから、使用菌株の復帰突然変異誘発物質に対する反応は適切であったことが確認され、試験は適切に実施されたものと考えられた。

以上の試験結果より、本試験条件下においてアクリル酸＝２－ボルニルは、微生物に対する遺伝子突然変異誘発能を有さない（陰性）と判定した。

(3)　参考事項

本被験物質によるプレート上の沈殿及び着色は代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの用量においても認められなかった。実体顕微鏡を用いて菌に対する生育阻害を観察した結果、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA 株の 9.77 µg/plate 以上、代謝活性化しない場合の *E. coli* WP2 *uvrA* の 19.5 µg/plate 以上、代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA 株の 39.1 µg/plate 以上、代謝活性化した場合の *E. coli* WP2 *uvrA* の 156 µg/plate 以上の用量で生育阻害が認められた。

用量設定試験において、代謝活性化しない場合のすべての菌株及び代謝活性化する場合の *S. typhimurium* TA 株については、生育阻害を示さない用量が 4 用量以上得られなかったことから、同一用量で本試験を 2 回実施した。

被験液の調製及び試験操作は、紫外線吸収膜付蛍光灯下で実施した。

10. その他

試験実施施設	名　称	株式会社ボゾリサーチセンター　東京研究所
	所 在 地	東京都世田谷区羽根木 1-3-11　電話 03(3327)2114 FAX03(3327)2115
試験責任者	職 氏 名	[redacted]
	経験年数	[redacted]
試験番号	T-1455	
試験期間	2013 年 12 月 11 日より 2014 年 3 月 14 日	

（別表1）

試 験 結 果 表（用量設定試験）

被験物質の名称： アクリル酸＝２－ボルニル

No. T-1455

試験実施期間		2014年1月21日 より 2014年1月24日				
代謝活性化系の有無	被験物質の用量（μg/ﾌﾟﾚｰﾄ）	復帰変異数（コロニー数/プレート）				
		塩基対置換型			フレームシフト型	
		TA100	TA1535	WP2*uvrA*	TA98	TA1537
S9Mix（－）	陰性対照（アセトン）	96 96 （ 96）	8 11 （ 10）	21 19 （ 20）	18 14 （ 16）	9 7 （ 8）
	1.22	114 118 （ 116）	11 13 （ 12）	12 19 （ 16）	22 23 （ 23）	9 5 （ 7）
	4.88	119 117 （ 118）	4 7 （ 6）	19 15 （ 17）	13 11 （ 12）	11 6 （ 9）
	19.5	48 ＊ 56 ＊（ 52）	0 ＊ 0 ＊（ 0）	17 ＊ 13 ＊（ 15）	10 ＊ 5 ＊（ 8）	0 ＊ 0 ＊（ 0）
	78.1	0 ＊ 0 ＊（ 0）	0 ＊ 0 ＊（ 0）	14 ＊ 18 ＊（ 16）	7 ＊ 4 ＊（ 6）	0 ＊ 0 ＊（ 0）
	313	0 ＊ 0 ＊（ 0）	0 ＊ 0 ＊（ 0）	18 ＊ 16 ＊（ 17）	4 ＊ 4 ＊（ 4）	0 ＊ 0 ＊（ 0）
	1250	0 ＊ 0 ＊（ 0）	0 ＊ 0 ＊（ 0）	12 ＊ 18 ＊（ 15）	7 ＊ 7 ＊（ 7）	0 ＊ 0 ＊（ 0）
	5000	0 ＊ 0 ＊（ 0）	0 ＊ 0 ＊（ 0）	16 ＊ 15 ＊（ 16）	9 ＊ 9 ＊（ 9）	0 ＊ 0 ＊（ 0）
S9Mix（＋）	陰性対照（アセトン）	140 149 （ 145）	15 16 （ 16）	31 25 （ 28）	33 38 （ 36）	10 13 （ 12）
	1.22	146 120 （ 133）	10 8 （ 9）	31 22 （ 27）	31 43 （ 37）	9 6 （ 8）
	4.88	143 143 （ 143）	16 13 （ 15）	15 23 （ 19）	42 39 （ 41）	7 6 （ 7）
	19.5	135 119 （ 127）	17 13 （ 15）	28 23 （ 26）	38 32 （ 35）	6 9 （ 8）
	78.1	96 ＊ 93 ＊（ 95）	7 ＊ 7 ＊（ 7）	27 21 （ 24）	24 ＊ 21 ＊（ 23）	5 ＊ 5 ＊（ 5）
	313	67 ＊ 65 ＊（ 66）	0 ＊ 0 ＊（ 0）	18 ＊ 22 ＊（ 20）	21 ＊ 30 ＊（ 26）	4 ＊ 7 ＊（ 6）
	1250	85 ＊ 73 ＊（ 79）	0 ＊ 0 ＊（ 0）	20 ＊ 13 ＊（ 17）	18 ＊ 15 ＊（ 17）	0 ＊ 0 ＊（ 0）
	5000	80 ＊ 51 ＊（ 66）	0 ＊ 0 ＊（ 0）	16 ＊ 16 ＊（ 16）	19 ＊ 11 ＊（ 15）	0 ＊ 0 ＊（ 0）
陽性対照 S9Mixを必要としないもの	名 称	AF-2	SAZ	AF-2	AF-2	ICR-191
	用量（μg/ﾌﾟﾚｰﾄ）	0.01	0.5	0.01	0.1	1.0
	ｺﾛﾆｰ数/ﾌﾟﾚｰﾄ	472 537 （ 505）	171 189 （ 180）	62 55 （ 59）	376 357 （ 367）	1214 1310 （ 1262）
陽性対照 S9Mixを必要とするもの	名 称	B[*a*]P	2AA	2AA	B[*a*]P	B[*a*]P
	用量（μg/ﾌﾟﾚｰﾄ）	5.0	2.0	10.0	5.0	5.0
	ｺﾛﾆｰ数/ﾌﾟﾚｰﾄ	894 1038 （ 966）	337 376 （ 357）	1093 1146 （ 1120）	346 382 （ 364）	73 118 （ 96）

（備考）

AF-2 ：2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド
SAZ ：アジ化ナトリウム
ICR-191 ：2-メトキシ-6-クロロ-9-[3-(2-クロロエチル)アミノプロピルアミノ]アクリジン・2HCl
2AA ：2-アミノアントラセン
B[*a*]P ：ベンゾ[*a*]ピレン

＊：被験物質による生育阻害が認められたことを示す。
（ ）内は、2枚のプレートの平均値を示す。

（別表2）

試 験 結 果 表（本試験1回目）

被験物質の名称： アクリル酸＝２－ボルニル

No. T-1455

試験実施期間		2014年2月3日　より　2014年2月6日				
代謝活性化系の有無	被験物質の用量（μg/ﾌﾟﾚｰﾄ）	復帰変異数（コロニー数/プレート）				
		塩基対置換型			フレームシフト型	
		TA100	TA1535	WP2*uvrA*	TA98	TA1537
S9Mix（－）	陰性対照（アセトン）	91 106　（　99）	7 10　（　9）	16 19　（　18）	30 18　（　24）	7 10　（　9）
	0.61	96 98　（　97）	14 9　（　12）	10 17　（　14）	19 36　（　28）	5 6　（　6）
	1.22	111 90　（　101）	11 10　（　11）	14 16　（　15）	19 30　（　25）	8 8　（　8）
	2.44	88 103　（　96）	8 11　（　10）	20 16　（　18）	24 16　（　20）	2 5　（　4）
	4.88	105 107　（　106）	8 15　（　12）	18 13　（　16）	19 27　（　23）	8 6　（　7）
	9.77	68＊ 65＊（　67）	6＊ 2＊（　4）	29 20　（　25）	23＊ 16＊（　20）	5＊ 1＊（　3）
	19.5	0＊ 0＊（　0）	0＊ 0＊（　0）	0＊ 0＊（　0）	0＊ 0＊（　0）	0＊ 0＊（　0）
S9Mix（＋）	陰性対照（アセトン）	99 113　（　106）	10 10　（　10）	21 16　（　19）	36 40　（　38）	8 14　（　11）
	2.44	143 125　（　134）	10 16　（　13）	NT	54 42　（　48）	7 11　（　9）
	4.88	135 107　（　121）	11 10　（　11）	NT	27 37　（　32）	10 12　（　11）
	9.77	121 117　（　119）	13 13　（　13）	15 22　（　19）	41 30　（　36）	7 2　（　5）
	19.5	137 139　（　138）	5 14　（　10）	19 29　（　24）	25 33　（　29）	6 7　（　7）
	39.1	66＊ 74＊（　70）	8＊ 10＊（　9）	26 26　（　26）	34＊ 38＊（　36）	8＊ 10＊（　9）
	78.1	0＊ 0＊（　0）	0＊ 0＊（　0）	19 13　（　16）	0＊ 0＊（　0）	0＊ 0＊（　0）
	156	NT	NT	19＊ 13＊（　16）	NT	NT
	313	NT	NT	13＊ 8＊（　11）	NT	NT
陽性対照 S9Mixを必要としないもの	名　称	AF-2	SAZ	AF-2	AF-2	ICR-191
	用量（μg/ﾌﾟﾚｰﾄ）	0.01	0.5	0.01	0.1	1.0
	ｺﾛﾆｰ数/ﾌﾟﾚｰﾄ	623 406　（　515）	271 216　（　244）	59 66　（　63）	375 355　（　365）	1237 961　（　1099）
陽性対照 S9Mixを必要とするもの	名　称	B[*a*]P	2AA	2AA	B[*a*]P	B[*a*]P
	用量（μg/ﾌﾟﾚｰﾄ）	5.0	2.0	10.0	5.0	5.0
	ｺﾛﾆｰ数/ﾌﾟﾚｰﾄ	727 832　（　780）	258 220　（　239）	752 655　（　704）	272 333　（　303）	82 111　（　97）

（備考）

AF-2　：2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド
SAZ　：アジ化ナトリウム
ICR-191　：2-メトキシ-6-クロロ-9-[3-(2-クロロエチル)アミノプロピルアミノ]アクリジン・2HCl
2AA　：2-アミノアントラセン
B[*a*]P　：ベンゾ[*a*]ピレン

＊：被験物質による生育阻害が認められたことを示す。
NT：試験せず。
（　）内は、2枚のプレートの平均値を示す。

（別表3）

試 験 結 果 表（本試験2回目）

被験物質の名称： アクリル酸＝２－ボルニル

No. T-1455

試験実施期間		2014年2月11日　より　2014年2月14日				
代謝活性化系の有無	被験物質の用量（μg/ﾌﾟﾚｰﾄ）	復帰変異数（コロニー数/プレート）				
		塩基対置換型			フレームシフト型	
		TA100	TA1535	WP2*uvrA*	TA98	TA1537
S9Mix（－）	陰性対照（アセトン）	91 97　（　94）	8 8　（　8）	27 15　（　21）	14 13　（　14）	9 4　（　7）
	0.61	105 86　（　96）	5 4　（　5）	16 19　（　18）	16 19　（　18）	5 3　（　4）
	1.22	97 88　（　93）	11 4　（　8）	24 25　（　25）	17 13　（　15）	4 5　（　5）
	2.44	88 99　（　94）	8 4　（　6）	16 28　（　22）	18 11　（　15）	4 5　（　5）
	4.88	93 93　（　93）	8 7　（　8）	15 19　（　17）	12 15　（　14）	3 4　（　4）
	9.77	108＊ 80＊（　94）	4＊ 9＊（　7）	13 22　（　18）	15＊ 18＊（　17）	5＊ 5＊（　5）
	19.5	84＊ 52＊（　68）	6＊ 5＊（　6）	14＊ 13＊（　14）	11＊ 12＊（　12）	0＊ 0＊（　0）
S9Mix（＋）	陰性対照（アセトン）	106 131　（　119）	7 9　（　8）		32 31　（　32）	9 7　（　8）
	2.44	121 119　（　120）	13 10　（　12）		36 27　（　32）	14 10　（　12）
	4.88	102 128　（　115）	11 7　（　9）		31 25　（　28）	8 5　（　7）
	9.77	146 142　（　144）	11 11　（　11）		27 32　（　30）	5 2　（　4）
	19.5	145 149　（　147）	8 11　（　10）		37 28　（　33）	9 3　（　6）
	39.1	128＊ 131＊（　130）	11＊ 6＊（　9）		32＊ 20＊（　26）	4＊ 11＊（　8）
	78.1	106＊ 99＊（　103）	7＊ 6＊（　7）		24＊ 25＊（　25）	2＊ 6＊（　4）
陽性対照 S9Mixを必要としないもの	名　称	AF-2	SAZ	AF-2	AF-2	ICR-191
	用量（μg/ﾌﾟﾚｰﾄ）	0.01	0.5	0.01	0.1	1.0
	ｺﾛﾆｰ数/ﾌﾟﾚｰﾄ	600 577　（　589）	235 253　（　244）	67 67　（　67）	339 302　（　321）	1315 1142　（　1229）
陽性対照 S9Mixを必要とするもの	名　称	B[*a*]P	2AA		B[*a*]P	B[*a*]P
	用量（μg/ﾌﾟﾚｰﾄ）	5.0	2.0		5.0	5.0
	ｺﾛﾆｰ数/ﾌﾟﾚｰﾄ	964 1028　（　996）	305 276　（　291）		412 416　（　414）	82 83　（　83）

（備考）

AF-2　：2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド
SAZ　：アジ化ナトリウム
ICR-191　：2-メトキシ-6-クロロ-9-[3-(2-クロロエチル)アミノプロピルアミノ]アクリジン・2HCl
2AA　：2-アミノアントラセン
B[*a*]P　：ベンゾ[*a*]ピレン

＊：被験物質による生育阻害が認められたことを示す。
（　）内は、2枚のプレートの平均値を示す。

図 1

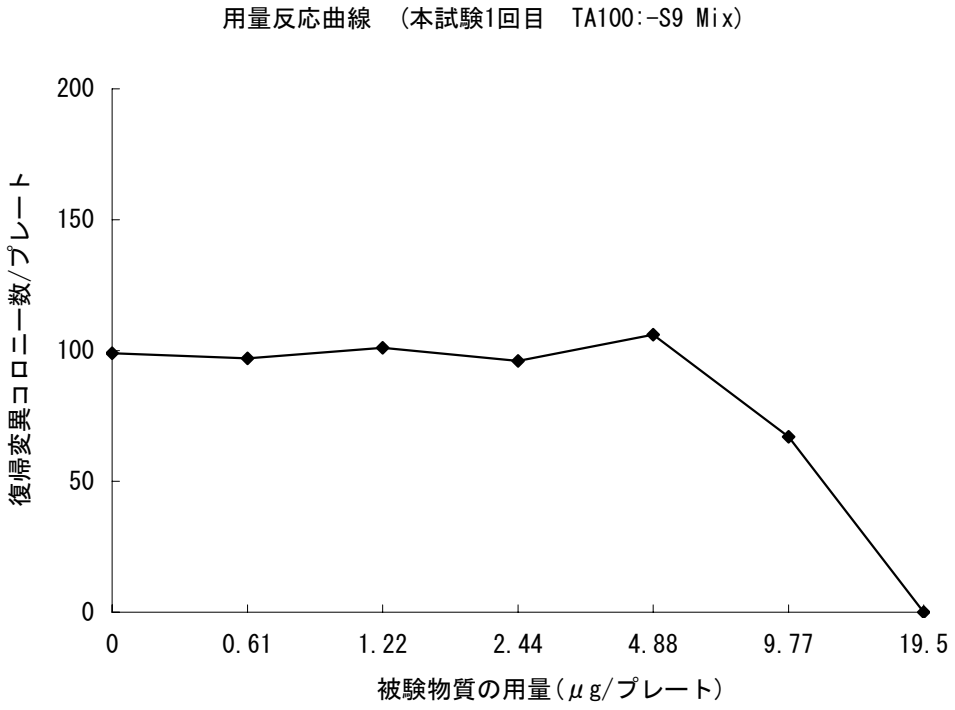

用量反応曲線　(本試験1回目　TA100:-S9 Mix)
復帰変異コロニー数/プレート
200
150
100
50
0
0
0.61
1.22
2.44
4.88
9.77
19.5
被験物質の用量(μg/プレート)

図 2

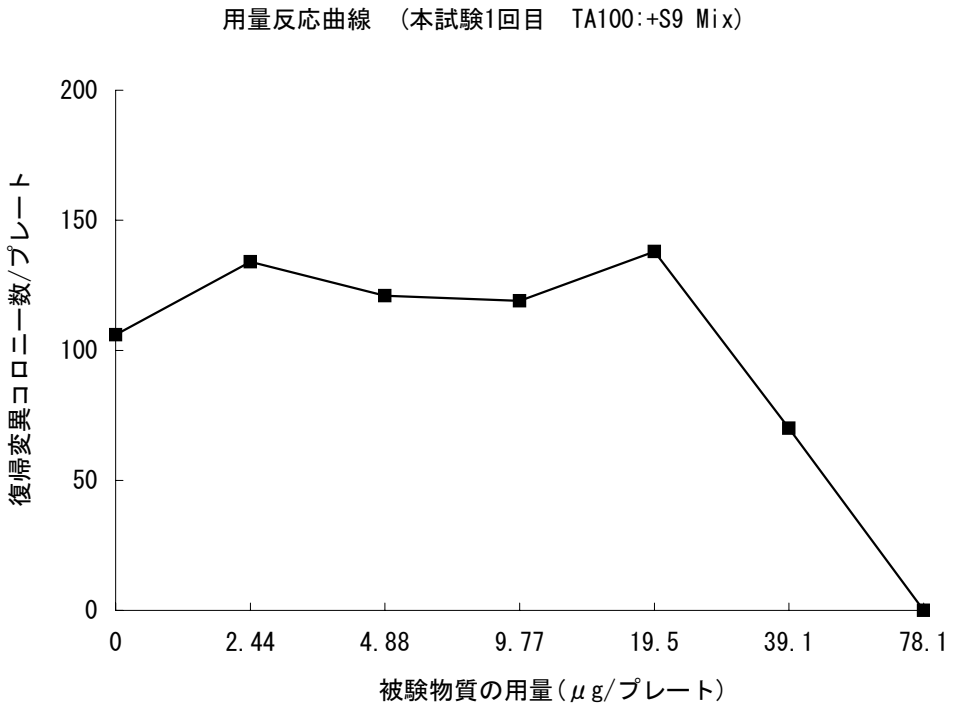

用量反応曲線　(本試験1回目　TA100:+S9 Mix)
復帰変異コロニー数/プレート
200
150
100
50
0
0
2.44
4.88
9.77
19.5
39.1
78.1
被験物質の用量(μg/プレート)

図 3

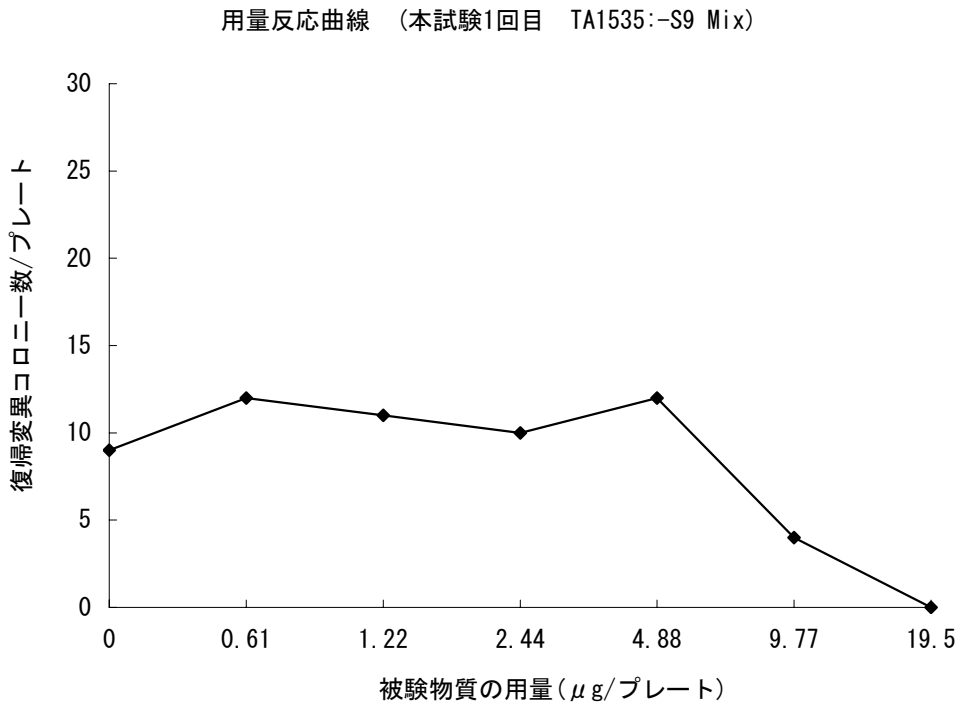

用量反応曲線　(本試験1回目　TA1535:-S9 Mix)
復帰変異コロニー数/プレート
30
25
20
15
10
5
0
0
0.61
1.22
2.44
4.88
9.77
19.5
被験物質の用量(μg/プレート)

図 4

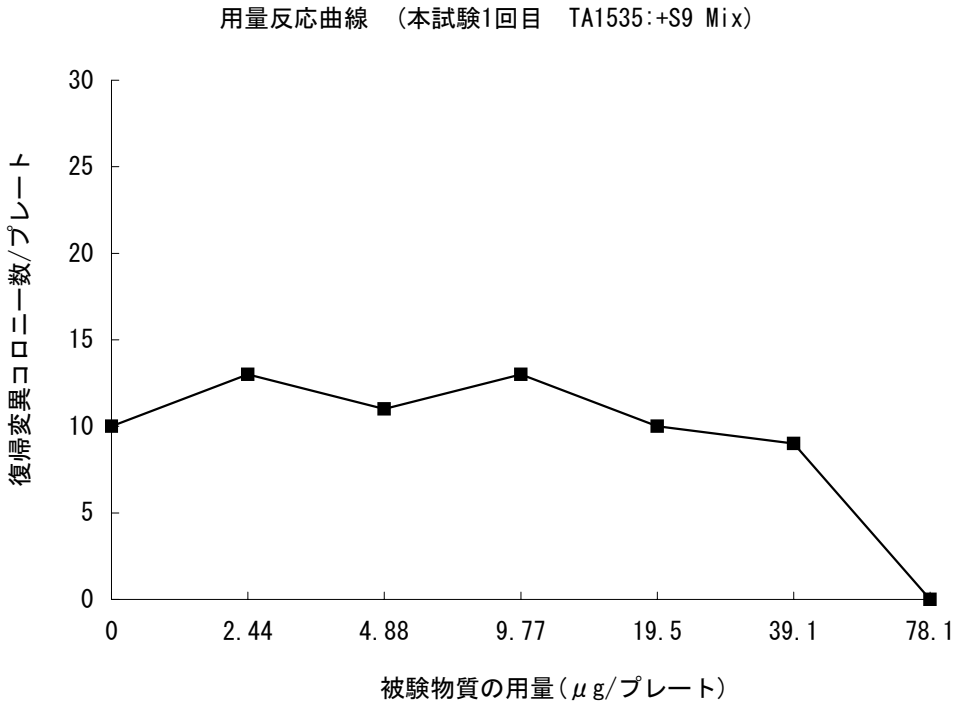

用量反応曲線　(本試験1回目　TA1535:+S9 Mix)
復帰変異コロニー数/プレート
30
25
20
15
10
5
0
0
2.44
4.88
9.77
19.5
39.1
78.1
被験物質の用量(μg/プレート)

図 5

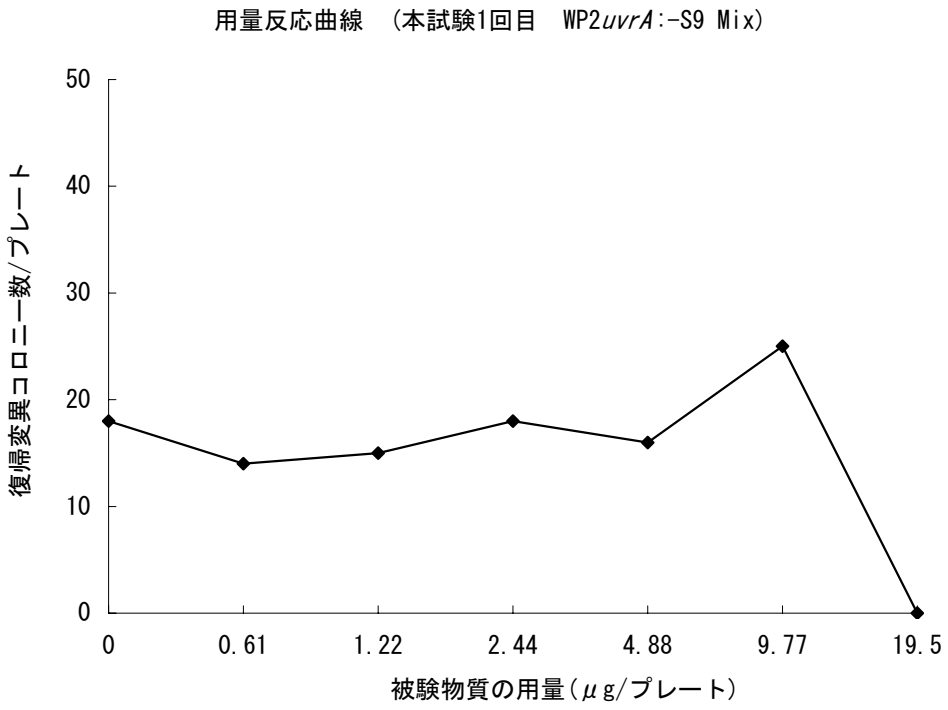

用量反応曲線　(本試験1回目　WP2*uvrA*:-S9 Mix)
復帰変異コロニー数/プレート
50
40
30
20
10
0
0
0.61
1.22
2.44
4.88
9.77
19.5
被験物質の用量(μg/プレート)

図 6

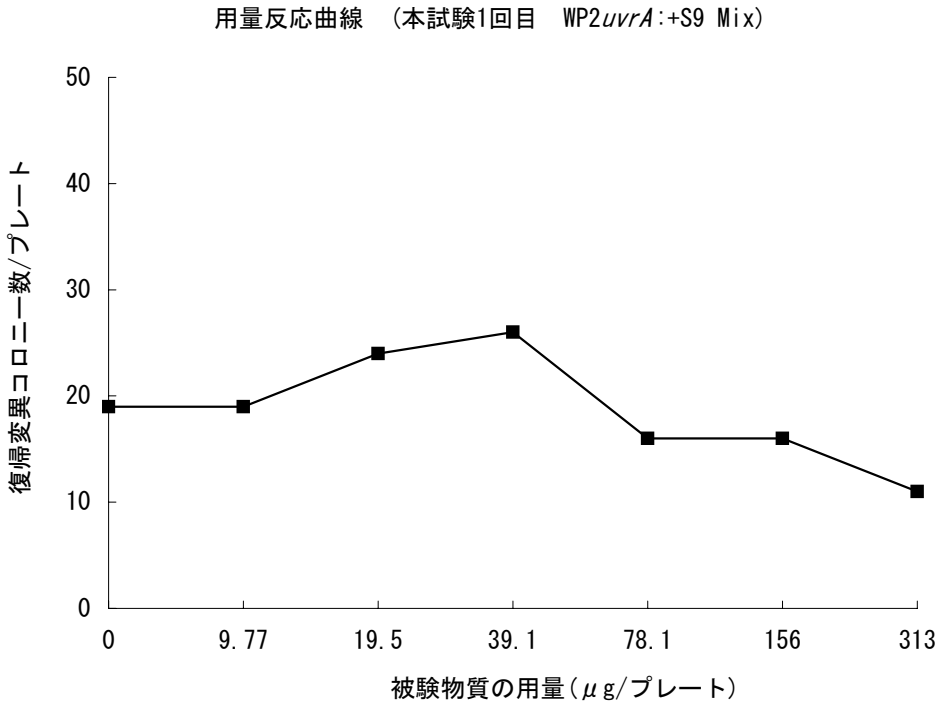

用量反応曲線　(本試験1回目　WP2*uvrA*:+S9 Mix)
復帰変異コロニー数/プレート
50
40
30
20
10
0
0
9.77
19.5
39.1
78.1
156
313
被験物質の用量(μg/プレート)

図 7

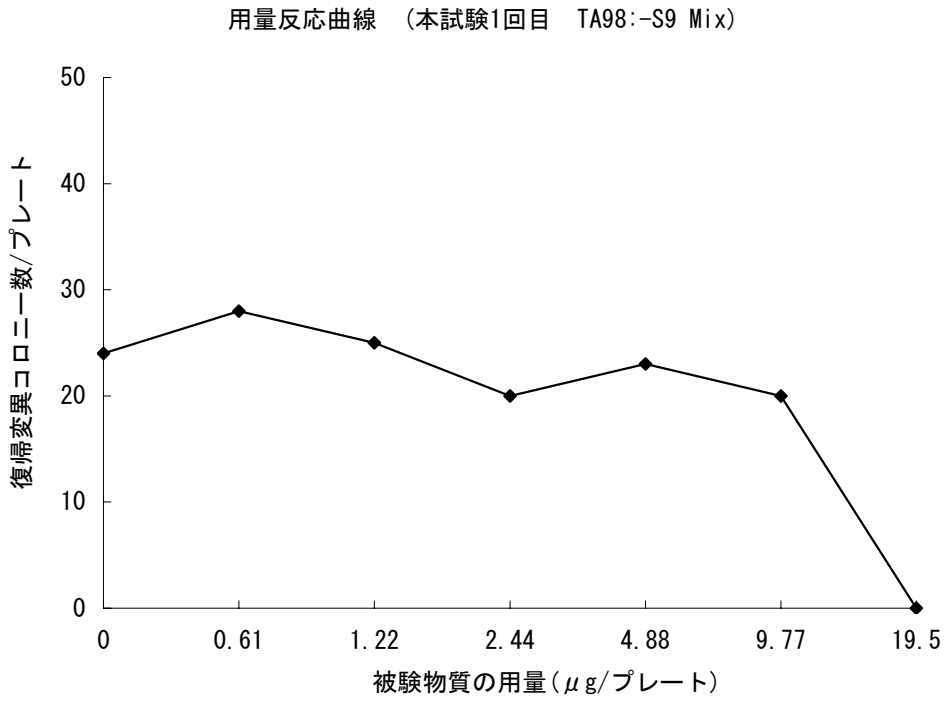

用量反応曲線　(本試験1回目　TA98:-S9 Mix)
復帰変異コロニー数/プレート
50
40
30
20
10
0
0
0.61
1.22
2.44
4.88
9.77
19.5
被験物質の用量(μg/プレート)

図 8

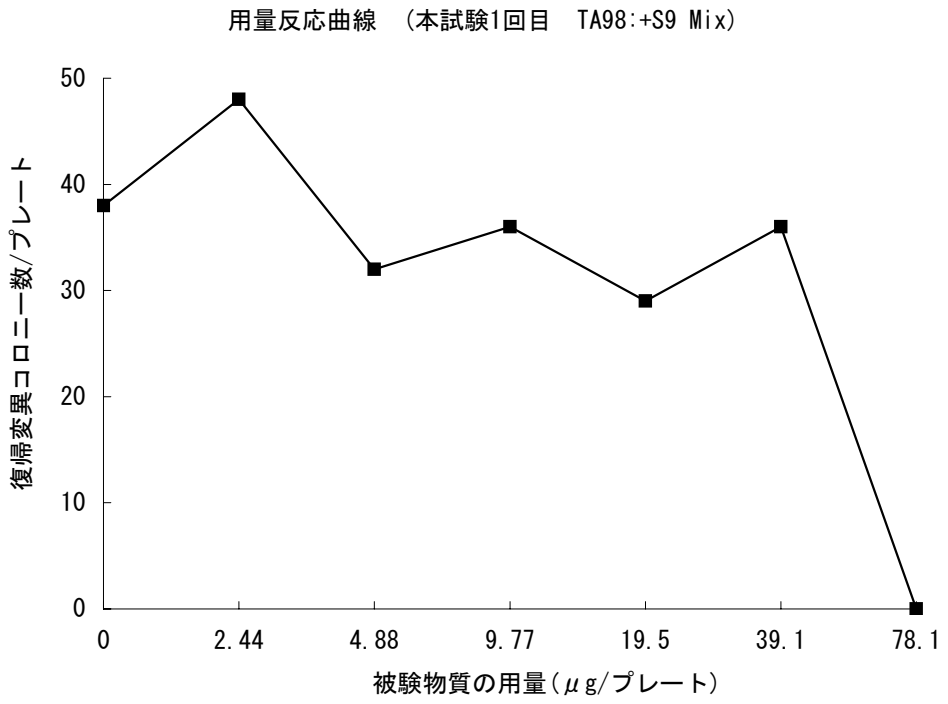

用量反応曲線　(本試験1回目　TA98:+S9 Mix)
復帰変異コロニー数/プレート
50
40
30
20
10
0
0
2.44
4.88
9.77
19.5
39.1
78.1
被験物質の用量(μg/プレート)

図 9

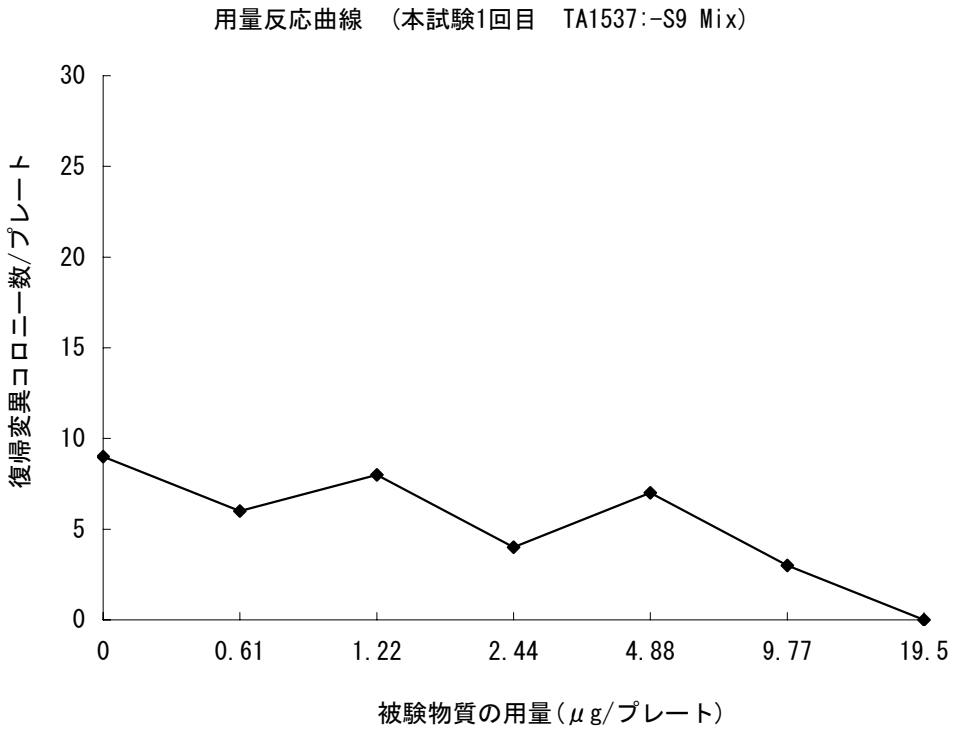
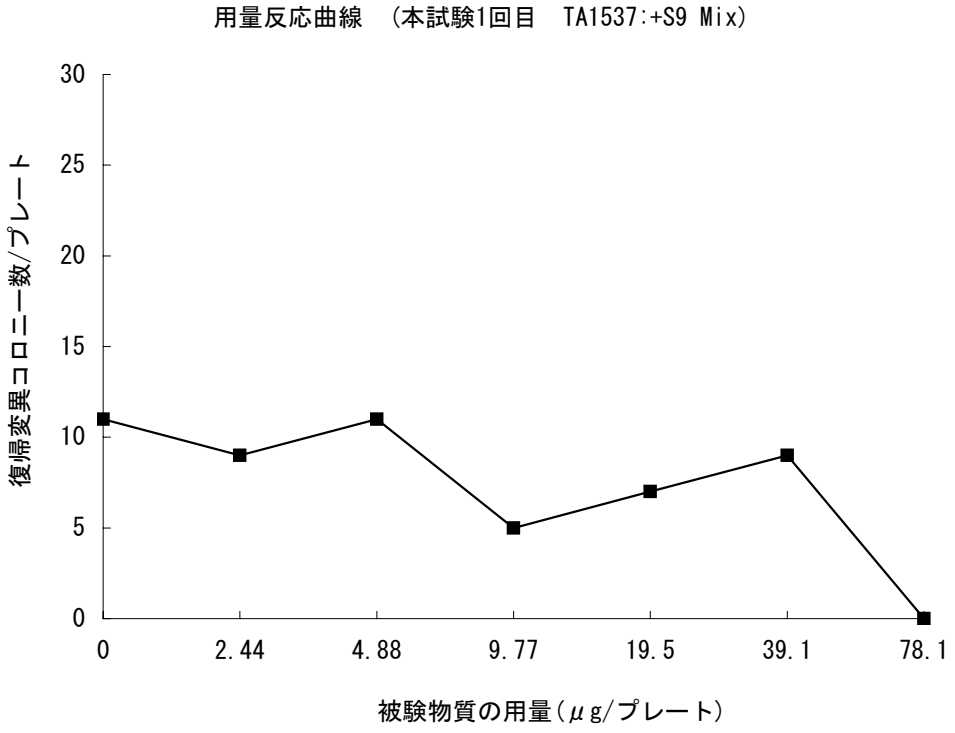

用量反応曲線　(本試験1回目　TA1537:-S9 Mix)
復帰変異コロニー数/プレート
30
25
20
15
10
5
0
0
0.61
1.22
2.44
4.88
9.77
19.5
被験物質の用量(μg/プレート)

図 10


用量反応曲線　(本試験1回目　TA1537:+S9 Mix)
復帰変異コロニー数/プレート
30
25
20
15
10
5
0
0
2.44
4.88
9.77
19.5
39.1
78.1
被験物質の用量(μg/プレート)